中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原蛋白cDNA的克隆与序列分析

施婉君，张素方，张传溪，程家安*
（浙江大学应用昆虫学研究所，杭州 310029）

摘要：分别从中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 工蜂毒腺中抽提总 RNA，通过 RT-PCR 方法扩增，各得到了蜂毒前溶血肽原蛋白的 cDNA，再将扩增产物克隆到 pGEM® -T easy 载体上，进行测序和序列分析。结果表明，所扩增到的这两个片段长度均为 213 bp，均为编码蜂毒前溶血肽原的 cDNA，并分别推导出两者所编码的氨基酸序列。经序列比较，中华蜜蜂前溶血肽原与意大利蜜蜂、印度蜜蜂 *Apis cerana indica* 前溶血肽原的同源性都为 97%。所报道的中华蜜蜂蜂毒前溶血肽原的核苷酸序列的 GenBank 登录号为 AF487907。

关键词：中华蜜蜂；意大利蜜蜂；蜂毒前溶血肽原；克隆；序列分析
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）02-0254-05

Cloning and sequencing of cDNA encoding prepromelittin in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

SHI Wan-Jun，ZHANG Su-Fang，ZHANG Chuan-Xi，CHENG Jia-An*（Institute of Applied Entomology，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China）

Abstract：Two cDNA fragments encoding prepromelittin were amplified by RT-PCR from the total RNA from the venom glands of the worker honeybees，*Apis cerana cerana* and *A. mellifera*. The PCR products were ligated into pGEM® -T easy vector. The results of sequencing showed that the ORFs coding for prepromelittin were all 213 bp in length. The amino acid sequence of *A. cerana cerana* prepromelittin shared 97% homologies with that of *A. mellifera* prepromelittin and *A. cerana indica* prepromelittin. The nucleotide sequence reported here was submitted to GenBank with accession no. AF487907.

Key words：*Apis cerana cerana*；*Apis mellifera*；prepromelittin；clone；sequence analysis

蜂毒溶血肽（melittin）是蜂毒的基本组成成分，约占蜂毒的 40%～50%，它是一种生物活性肽，具有重要的医学价值，具抗菌、抗炎、抗辐射、抗关节炎等作用（朱伟等，2001），也可用于心血管等疾病的治疗（游育红，1994），对肿瘤细胞也具有明显的抑制作用（钱锐，1986）。蜂毒溶血肽对细胞膜具有很强的表面活性，其透过卵磷脂膜和混合脂膜的速度为任何表面活性剂所不及，这一性质使其受到生物膜研究工作者的高度重视，现已成为一种模型肽，已被广泛用于膜作用机制、钙调蛋白作用机理等方面的研究（施桦和董纳新等，1993）。另外溶血肽在农业上也具有潜在的应用价值（Boman *et al.*，1989；刘艳荷等，2001），主要表现在植物保护方面，它可抵御多种病原物的侵染，具有抗细菌、真菌的作用，对害虫也具有较强的毒性，溶血肽对美洲棉铃虫 *Heliothis zea* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 24 h 的 LD_{50} 分别为 29 μg/幼虫和 15 μg/g。

蜂毒前溶血肽原蛋白（prepromelittin）具有 70 个氨基酸，是蜜蜂蜂毒前溶血肽原 mRNA 的最初翻

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30271008）
作者简介：施婉君，女，1975 年 9 月生，浙江黄岩人，在读博士，从事分子生物学和生态学研究，E-mail：shiwanjun@yahoo.com
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：chxzhang@zju.edu.cn；jacheng@zju.edu.cn
收稿日期 Received：2002-03-14；接受日期 Accepted：2003-01-07

译产物，而蜂毒溶血肽则是蜂毒前溶血肽原 mRNA 翻译加工后的终产物，它位于前溶血肽原蛋白的 COOH—端（第 44～70 位残基）。尽管 20 世纪 70 年代以来，欧美学者已对意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 蜂毒前溶血肽原作了卓有成效的研究，克隆并测出其基因序列（Gerda *et al*.，1978；Gunther *et al*.，1980；Terwilliger and Eisenberg，1982a，1982b；Vlasak *et al*.，1983）。近来我们实验室也已开展了对中华蜜蜂 *A. cerana cerana* 蜂毒的分子生物学研究（Shen *et al*.，2001；沈立荣等，2002），并首次报道了中华蜜蜂的前溶血肽原蛋白 cDNA 的克隆和序列，为进一步开发利用该基因提供基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　蜜蜂、菌株与载体：中华蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂系采自浙江大学蜜蜂研究所蜂场；菌株 *E. coli* JM109 由浙江大学昆虫分子生物学实验室保存；pGEM® -T easy 载体购自 Promega 公司。

1.1.2　酶和试剂：限制性内切酶（*Xho*Ⅰ、*Hin*dⅢ）、X-gal、IPTG、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL2000 + 15000 购自 Takara 公司；RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI Fermentas 公司；Taq Plus DNA 聚合酶、DEPC 购自 Sangon 公司；Trizol 购自 GIBco BRL 公司；QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　PCR 引物设计：参照已发表的欧洲意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原蛋白基因序列（Vlasak *et al*.，1983）设计 PCR 扩增引物，FP1 为 5′引物序列：GCTCGAGATGAAATTCTTAGTCAACGTT，RP2 为 3′引物序列：GAAGCTTCTAACCCTGTTGCCTCTT，为便于克隆和表达，两个引物分别引入了 *Xho*Ⅰ和 *Hin*dⅢ酶切位点。

1.2.2　蜂毒总 RNA 提取：从活体蜜蜂工蜂中取出毒腺，按 Trizol 试剂盒说明书抽提其总 RNA。

1.2.3　RT-PCR 扩增目的基因片段：用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 将蜂毒总 RNA 反转录成 cDNA 第一链，再用 FP1、RP2 引物和 Taq Plus DNA 聚合酶，经 PCR 反应从 cDNAs 中扩增出目的基因。PCR 反应条件为 94℃变性 40 s，54℃退火 40 s，72℃延伸 60 s，共进行 30 个循环，最后 72℃延伸 10 min。RT-PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.4　PCR 产物的克隆：PCR 扩增产物经 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后，与 pGEM® -T easy 载体连接，转化 JM109 感受态细胞，接在含 Ampicillin、X-gal、IPTG 的 LB 平板培养基培养后，挑选白斑作单菌落培养，按碱法抽提质粒，经酶切鉴定和 PCR 扩增检查插入片段的大小，筛选出阳性克隆。

1.2.5　DNA 测序及序列分析：阳性克隆由 Sangon 公司进行 DNA 测序，测序结果采用 Gentyx 软件进行 DNA 序列比较，用 DNA Club 软件进行氨基酸序列推导，用 Internet 网的 Blast 软件进行同源性序列检索，并用 Omiga 软件与其他相关昆虫蜂毒前溶血肽原蛋白氨基酸序列进行同源性比较。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原基因

经 RT-PCR 反应，中华蜜蜂和意大利蜜蜂均扩增出大小约为 200 bp 的 DNA 产物（图 1、图 2）。与已报道的欧洲意大利蜜蜂的前溶血肽原基因大小一致。

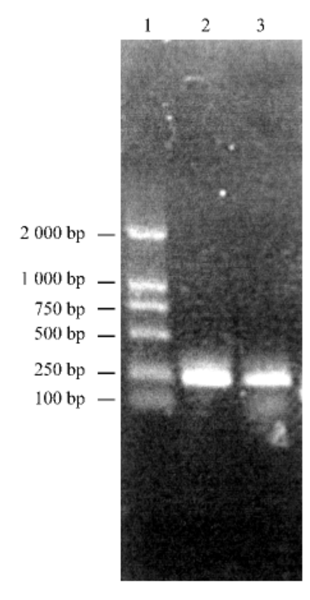


图 1　中华蜜蜂蜂毒前溶血肽原蛋白 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1　Agarose electrophoresis of prepromelittin RT-PCR product of *A. cerana cerana*

1. 标准蛋白分子量 DNA marker；2，3. 蜂毒前溶血肽原蛋白 RT-PCR 产物 prepromelittin RT-PCR product

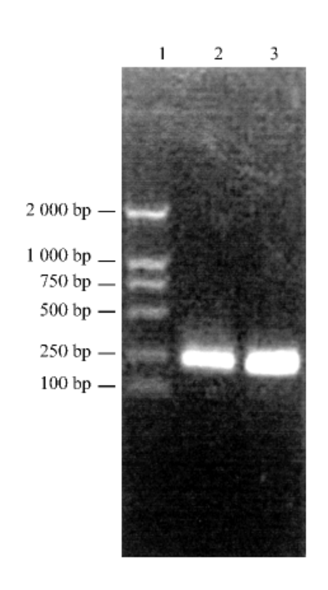


图 2 意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原蛋白 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 2 Agarose electrophoresis of prepromelittin RT-PCR product of *A. mellifera*

1. 标准蛋白分子量 DNA marker; 2, 3. 蜂毒前溶血肽原蛋白 RT-PCR 产物 prepromelittin RT-PCR product

2.2 PCR 产物克隆入 pGEM® -T easy 载体

中华蜜蜂和意大利蜜蜂 RT-PCR 产物经 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后分别克隆入 pGEM® -T easy 载体，形成的重组质粒分别称为 pGEM-PPMc 和 pGEM-PPMm。经克隆筛选，用碱法提取质粒 DNA，经 *Xho* Ⅰ、*Hin*dⅢ 双酶切及 PCR 扩增鉴定，证明插入片断大小正确（图3、图4）。

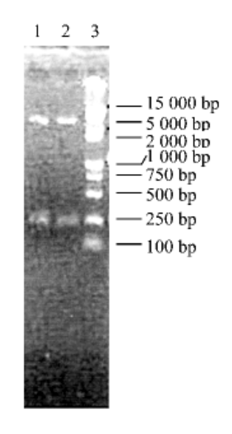


图 3 重组质粒 pGEM-PPMc 和 pGEM-PPMm 的 *Xho* Ⅰ、*Hin*dⅢ 双酶切电泳图谱

Fig. 3 Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmid pGEM-PPMc and pGEM-PPMm with *Xho* Ⅰ、*Hin*dⅢ

1. 中华蜜蜂 *A. cerana cerana*; 2. 意大利蜜蜂 *A. mellifera*; 3. 标准蛋白分子量 DNA marker

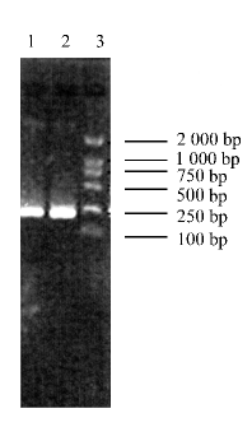


图 4 用引物 FP1 和 RP2 对重组质粒 pGEM-PPMc 和 pGEM-PPMm 中前溶血肽原基因的 PCR 检测

Fig. 4 PCR identification of the recombinant plasmid pGEM-PPMc and pGEM-PPMm with FP1 and RP2 primers

1. 中华蜜蜂 *A. cerana cerana*; 2. 意大利蜜蜂 *A. mellifera*; 3. 标准蛋白分子量 DNA marker

2.3 序列分析

对所选出的含有中华蜜蜂和意大利蜜蜂前溶血肽原基因的阳性克隆作 DNA 测序，结果见图5。我们测定的中华蜜蜂和意大利蜜蜂编码前溶血肽原蛋白的基因编码区序列均为 213 bp，两者有 200 个核苷酸一致，同源性为 93%；从 cDNA 推导出的 70 个氨基酸残基中，两者有 68 个完全一致，同源性为 97%。而我们所测的意大利蜜蜂前溶血肽原 cDNA 序列、氨基酸序列与已报道的欧洲意大利蜜蜂前溶血肽原（GenBank 登录号：X02007）编码区的 cDNA 序列、氨基酸序列完全一致。我们报道的中华蜜蜂蜂毒前溶血肽原核苷酸序列的 GenBank 登录号为 AF487907。

同时将本结果从 cDNA 推导出的中华蜜蜂和意大利蜜蜂前溶血肽原氨基酸序列与印度蜜蜂前溶血肽原（GenBank 登录号：P01501）氨基酸序列进行联配比较，结果列于图 6。从图 6 可见，3 种蜂前溶血肽原氨基酸序列间氨基酸残基完全相同的有 68 个，占 97%，中华蜜蜂前溶血肽原与意大利蜜蜂、印度蜜蜂前溶血肽原氨基酸序列的同源性都为 97%。



图 5　中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原 cDNA 序列比较

Fig. 5　Comparison of prepromelittin nucleotide sequences between *A. cerana cerana* prepromelittin and *A. mellifera*

```
A. mellifera       MKFLVNVALVFMVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALI   60
A. cerana indica   MKFLVNVALVFMVVYISYIYAAPEPEPAPEPEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALI   60
A. cerana cerana   MKFLVNVALVFMVVYISFIYAAPEPEPAPEAEAEADAEADPEAGIGAVLKVLTTGLPALI   60
                   *****************.************.*****************************

A. mellifera       SWIKRKRQQG                                                     70
A. cerana indica   SWIKRKRQQG                                                     70
A. cerana cerana   SWIKRKRQQG                                                     70
                   **********
```

图 6　中华蜜蜂蜂毒前溶血肽原与意大利蜜蜂、印度蜜蜂前溶血肽原氨基酸序列比较

Fig. 6　Comparison of prepromelittin amino acid sequences of *A. cerana cerana*, *A. mellifera* and *A. cerana indica*

3　讨论

蜜蜂在毒腺细胞中将前溶血肽原基因 mRNA 翻译成前溶血肽原（prepromelittin），并进一步加工成溶血肽原（promelittin）。溶血肽原是蜂毒溶血肽（melittin）的天然融合蛋白，无活性，由 52 个氨基酸组成，在毒腺细胞中经二肽酶Ⅳ水解最终生成溶血肽，贮存于毒囊中。以前体蛋白溶血肽原形式分泌蜂毒溶血肽，可能是蜂类为保护自身毒腺细胞免受溶血肽伤害的一种机制。

本研究结果表明，所测定的意大利蜜蜂前溶血肽原 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列都与已发表的欧洲意大利蜜蜂前溶血肽原的完全相同。从序列分析结果我们还可看出来源不同的前溶血肽原的保守性和差异，如中华蜜蜂与意大利蜜蜂、印度蜜蜂蜂毒前溶血肽原氨基酸序列的同源性均为 97%，具有高度保守性。并且三者前溶血肽原都具有 70 个氨基酸，都是由 21 个氨基酸组成的信号肽和 49 个氨基酸组成的成熟肽构成的，溶血肽都位于其 COOH—端（第 44 ~ 70 位残基），这说明了同属不同种和同种不同亚种的蜜蜂蜂毒前溶血肽原在功能上具有高度的一致性；但与意大利蜜蜂和印度蜜蜂前溶血肽原相比，中华蜜蜂前溶血肽原信号肽的第 18 位氨基酸“F”代替了前两者的“Y”，成熟肽的第 10 位氨基酸“A”代替了前两者的“P”。但中华蜜蜂、意大利蜜蜂和印度蜜蜂前溶血肽原的翻译终产物——溶血肽的氨基酸序列完全一样，并且它们与大蜜蜂 *Apis dorsata* 溶血肽（GenBank 登录号：P01502）、小蜜蜂 *Apis florea* 溶血肽（GenBank 登录号：P01504）氨基酸序列的同源性分别有 88% 和 80%。

蜂毒是一类具有药用和生物学价值的昆虫毒素资源。国内外学者已对意大利蜜蜂蜂毒溶血肽基因进行了一系列研究（Terwilliger and Eisenberg，1982a，1982b；李继周等，1997；陈仲兵等，1998；李大力等，2000；王关林等，2000，2001；），但尚未见对中华蜜蜂相关基因的研究报道。因此，本研究不仅为昆虫毒素分子生物学研究提供了新的数据，同时为利用基因工程技术开发蜂毒溶血肽打下了基础。进一步的基因表达及生物活性研究在进行中。

参　考　文　献（References）

Boman H G，Wade D，Boman I A，1989. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropinmelittin hybrids. *FEBS Lett.*，259：103 – 106.

Chen Z B，Zhang Q W，Li J Z，Cai Q N，Zhang F L，Guo Z，1998. Cloning and sequence analysis of melittin gene from honey bee（*Apis mellif-*

era). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6 (1): 96 – 100. [陈仲兵, 张青文, 李继周, 蔡青年, 张福林, 郭忠, 1998. 蜂毒溶血肽的克隆及序列分析. 农业生物技术学报, 6 (1): 96 – 100]

Gerda S, Gunther K, Hermodson M A, 1978. Amino acid sequence of honeybee prepromelittin synthesized *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75 (2): 701 – 704.

Gunther K, Liselotte H, Gerda S, 1980. Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase Ⅳ. *Eur. J. Biochem.*, 111: 49 – 58.

Li D L, Wang G L, Fang H J, 2000. Cloning and sequencing of promelittin cDNA and constructing of expression vector. *Journal of Dalian University of Technology*, 40 (2): 172 – 175. [李大力, 王关林, 方宏筠, 2000. 蜂毒肽前体蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. 大连理工大学学报, 40 (2): 172 – 175]

Li J Z, Chen Z B, Cai Q N, Zhang Q W, Guo Z, Zhang F L, Zhang Q, 1997. Cloning of melittin cDNA from honey bee. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 5 (2): 162 – 167. [李继周, 陈仲兵, 蔡青年, 张青文, 郭忠, 张福林, 张芩, 1997. 蜂毒溶血肽 (melittin) 的 cDNA 克隆. 农业生物技术学报, 5 (2): 162 – 167]

Liu Y H, Chen S L, Zhang C X, 2001. Advance in melittin research. *Entomological Knowledge*, 38 (6): 410 – 413. [刘艳荷, 陈盛禄, 张传溪, 2001. 蜂毒溶血肽的研究进展. 昆虫知识, 38 (6): 410 – 413]

Qian R, 1986. The experiment of bee venom suppress tumours *in vitro*. *Apiculture of China*, 3: 20 – 21. [钱锐, 1986. 蜂肽抑制肿瘤的体外实验. 中国养蜂, 3: 20 – 21]

Shen L R, Zhang C X, Cheng J A, 2001. Cloning and sequencing of gene encoding hyaluronidase from the venom of *Apis cerana cerana*. *Entomological Sinica*, 8 (4): 353 – 360.

Shen L R, Zhang C X, Cheng J A, 2002. Cloning and sequencing of genes encoding hyaluronidase from the venom of *Apis cerana cerana* and *A. mellifera*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 10 (1): 29 – 32. [沈立荣, 张传溪, 程家安, 2002. 中华蜜蜂、意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A2 基因的克隆及序列分析. 农业生物技术学报, 10 (1): 29 – 32]

Shi H, Dong N X, 1993. Effects of melittin on kinetics of bR intermediate M412 and proton pumping. *Acta Biophysica Sinica*, 9 (1): 149 – 152. [施桦, 董纳新, 1993. 蜂毒对菌紫质 (bR) 光循环中间体 M412 和质子泵的影响. 生物物理学报, 9 (1): 149 – 152]

Terwilliger T C, Eisenberg D, 1982a. The structure of melittin Ⅰ. Structure determination and partial refinement. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (11): 6 010 – 6 015.

Terwilliger T C, Eisenberg D, 1982b. The structure of melittin Ⅱ. Interpretation of the structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (11): 6 016 – 6 022.

Vlasak R, Ungen U C, Gunther K, Anna-Maria F, 1983. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin. *Eur. J. Biochem.*, 135: 123 – 126.

Wang G L, Li D L, Fang H J, 2000. Site-directed mutagenesis of melittin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Genetica Sinica*, 27 (2): 176 – 182. [王关林, 李大力, 方宏筠, 2000. 蜂毒溶血肽的定点诱变及其在大肠杆菌中的表达. 遗传学报, 27 (2): 176 – 182]

Wang G L, Li D L, Fang H J, 2001. Cloning of promelittin cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 41 (2): 181 – 185. [王关林, 李大力, 方宏筠, 2001. 蜂毒溶血肽前体蛋白 cDNA 的克隆及其融合蛋白的表达. 微生物学报, 41 (2): 181 – 185]

You Y H, 1994. The effects of melittin on vessel and heart. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 10 (4): 256 – 258. [游育红, 1994. 蜂毒素 (melittin) 的心血管作用. 中国药理学通报, 10 (4): 256 – 258]

Zhu W, Wang B X, Zhu X, 2001. Progress in the studies of melittin. *J. N. Bethune Univ. Med. Sci.*, 27 (2): 212 – 214. [朱伟, 王本祥, 朱迅, 2001. 蜂毒素的研究进展. 白求恩医科大学学报, 27 (2): 212 – 214]